Aus der Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. L. F. Müller

DIE FRUCTOSE - 1, 6 - DIPHOSPHATALDOLASE IM SERUM KLINISCH GESUNDER HUNDE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

Vorgelegt von:

Hanno Schleicher
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1966

Journal-Nr.: 533

Aus der Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. L. F. Müller

DIE FRUCTOSE - 1, 6 - DIPHOSPHATALDOLASE IM SERUM KLINISCH GESUNDER HUNDE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

Vorgelegt von:

Hanno Schleicher
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1966

Journal-Nr.: 533

Gedruckt mit der Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. L. F. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. Drepper

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1966

Meiner lieben Mutter gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0082

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Allgemeiner Teil

1. Entdeckung, Nomenklatur, Klassifizierung
2. Lokalisation
3. Biochemie der ALD
4. Übertritt der ALD ins Serum
5. Methodik der ALD - Bestimmung
6. Der Hämoglobingehalt von Plasma und Serum und die Bedeutung der Hämolyse für Aktivitätsbestimmungen von Enzymen
7. ALD-Aktivität im Serum von Mensch und Hund
8. Die diagnostische Bedeutung der ALD

III. Eigene Untersuchungen

1. Methode
   a) Grundlagen der Aldolasebestimmung
   b) Entnahme der Blutproben
   c) Geräte
2. Prüfung der Einflüsse, die auf die Bestimmung der ALD einwirken
   a) Der methodische Fehler
   b) Haltbarkeit
   c) Einfluß der Hämolyse auf die ALD-Aktivität
   d) Verdünnungen
3. Prüfung der Einflüsse, die auf die ALD-Aktivität im Serum einwirken
   a) Auswirkung körperlicher Belastung auf die ALD-Aktivität im Serum
   b) Tageszeitliche Schwankungen
4. Hundematerial
5. Ergebnisse
6. Diskussion

IV. Zusammenfassung

V. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Die Fructose - 1, 6 - diphosphataldolase hat Eingang in die enzymatische Diagnostik verschiedener innerer Erkrankungen des Menschen gefunden. Auch im Serum des Hundes wurde dieses Enzym schon bestimmt, meist aber im Rahmen experimenteller Untersuchungen.

Es ist Aufgabe dieser Arbeit, das Verhalten der Fructose - 1, 6 - diphosphataldolase im Serum des klinisch gesunden Hundes zu untersuchen und die Voraussetzungen für die praktische Bestimmung dieses Enzyms im Serum des Hundes zu schaffen.

II. Allgemeiner Teil

1. Entdeckung, Nomenklatur, Klassifizierung

Im Jahre 1934 entdeckten MEYERHOF und LOHMANN (24) ein Ferment, das die reversible Umsetzung von einem Molekül Hexosediphosphorsäure in zwei Moleküle Triosephosphorsäure bewirkte. Sie nannten es Zymohexase. Später wurde es Aldolase (ALD) und zur näheren Charakterisierung Fructose - 1, 6 - diphosphataldolase (FDP-Aldolase) genannt, weil die Kondensation dieser beiden Triosen eine Aldolkondensation ist (LEUTHARDT, 20). In dieser Arbeit wird für die FDP-Aldolase die Abkürzung ALD verwendet.

Die Aldolasen, z. B. die Fructose - 1 - phosphataldolase (FPA) und die Fructose - 1, 6 - diphosphataldolase gehören zu den glykolytischen Enzymen. Bei verschiedener Substratspezifität spalten und bilden sie C - C -Bindungen. Sie werden deshalb den Desmolasen zugeordnet (LEUTHARDT in Anlehnung an BALDWIN u. a., 20).

Nach BÜCHER (8) werden die im Blutplasma nachweisbaren Enzyme weniger nach biochemischen Gesichtspunkten, sondern nach ihrer biologischen Funktion und Herkunft in zwei Hauptgruppen, die plasmaspezifischen und die plasmaunspezifischen Enzyme, geordnet. Die plasmaspezifischen Enzyme sind Funktionsbestandteile des Blutes, für die plasmaunspezifischen Enzyme ist im Blutplasma eine Funktion nicht nachweisbar. Nach dieser Einteilung gehört die ALD zu den plasmaunspezifischen und zellunspezifischen Enzymen.

2. Lokalisation

Die ALD ist in der Natur weit verbreitet. Zuerst wurde sie im Muskelextrakt nachgewiesen (MEYERHOF und LOHMANN, 24). Später wurden die Eigenschaften der aus Bierhefe gewonnenen ALD beschrieben (WARBURG und CHRISTIAN, 40) und ihr Vorkommen in höheren Pflanzen erforscht (STUMPF, 35).

Wie eingehende Untersuchungen durch Fraktionierung gezeigt haben, ist die ALD hauptsächlich im cytoplasmatischen Raum der Zelle lokalisiert.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die intrazelluläre Verteilung der ALD in der gesunden menschlichen Muskulatur (LAUDAHN und HEYCK, 19):

Tabelle 1

Intrazelluläre Verteilung der ALD in %

Unreine Kernfraktion	Mitochondrien	Mikrosomen	Cytoplasma
4	0,6	0,3	90

Von allen Geweben enthält die Muskulatur weitaus am meisten ALD. 40 % der löslichen Eiweißkörper des Muskels bestehen aus Fermenten, an denen die ALD einen Anteil von 9,6 % hat (BEISENHERZ u.a., 2). Aber auch die anderen Gewebe des tierischen Organismus sind reichlich mit diesem Enzym ausgestattet. Tabelle 2 gibt einen auszugsweisen Überblick über die Aktivität der ALD in den gesunden Geweben der Ratte (SIBLEY und LEHNINGER, 31):

Tabelle 2

Werte[x)] = mm^3 HDP (= Fructose - 1,6 - diphosphat) gespalten/g Feuchtgewicht/Std. /38° C unter der Annahme, daß ein g Feuchtgewicht 0,2 g Trockengewicht entspricht.

Gewebe	Bereich	Mittelwert	Q_{HDP} [xx)]
Skelettmusk.	52400-105000	74800	374
Herzmusk.	12000- 19000	15800	68
Leber	8500- 14700	12100	61
Niere	6000- 10600	7800	38
Erythrocyt.	700- 1100	900	5
Serum	40- 90	60	0,3

x) = 22,4 mm^3 HDP = 1 Mikromol HDP

xx) = Q_{HDP} = (mm^3 HDP) / (mg Trockengewicht x Zeit in Stunden) bei 38° C.

Angaben ähnlicher Größenordnung über die Aktivität der ALD in den Geweben machten auch MEYERHOF und LOHMANN (25).

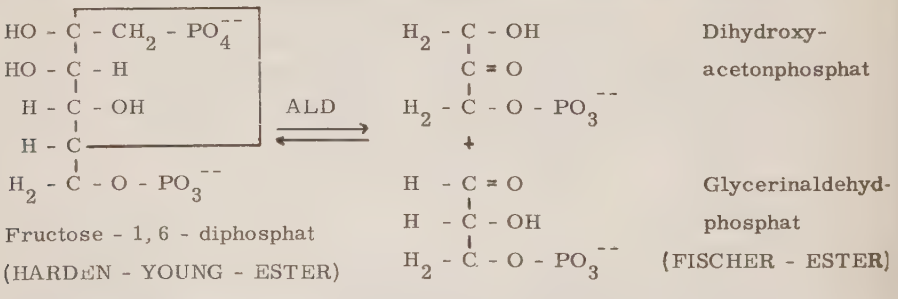
Mit dem absoluten Gehalt der Erythrocyten an ALD beschäftigte sich BRUNS (4). Aus seinen Untersuchungen geht hervor, daß der Aldolasegehalt

der roten Blutzellen bei den Tierarten unterschiedlich ist und in folgender Reihenfolge zunimmt: Schwein, Pferd, Rind, Hammel, Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn, Hund, Ratte, Mensch, Maus. Während die Erythrocyten des Schweines keine oder nur sehr wenig ALD enthalten, sind die des Menschen und der Maus sehr reichlich mit ihr ausgestattet.

Bei 10 Hunden verschiedenen Alters wurde im Hämolysat, das aus einem Teil Zellbrei und 9 Teilen Aqua dest. bestand, unter optimalen Bedingungen bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten ein Mittelwert von 722 (510 - 1080) E BRUNS /ml ermittelt. Das Serum dieser Hunde enthielt im Mittel 15 (12 - 22) E BRUNS /ml (BRUNS und KIRCHNER, 6). Aus der Tatsache, daß das menschliche Serum bei niedrigstem ALD-Gehalt des Serums und hoher Aktivität der Zellen im Gegensatz zum Schwein, das im Verhältnis zur niedrigen oder gar fehlenden Aktivität der roten Blutzellen einen relativ hohen Serumspiegel hat, wird geschlossen, daß offenbar keine Beziehung zwischen Erythrocyten- und Serumaldolase besteht (BRUNS, 4).

3. Biochemie der Aldolase

Bei hoher Substratspezifität (BRUNS, 4) spaltet die ALD Fructose - 1, 6 - diphosphat (HARDEN - YOUNG - ESTER) in die beiden Triosen Phosphodihydroxyaceton und Phosphoglycerinaldehyd (FISCHER - ESTER) :



Durch die Wirkung der Trioseisomerase liegt das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Triosen ganz auf der Seite des Phosphodihydroxyacetons, während Phosphoglycerinaldehyd nur zu 4 - 5 % vorhanden ist (MEYERHOF und JUNOWICZ - KOCHLATY, 23).

Im Gegensatz zur Muskelaldolase wird die ALD der Hefe durch Komplexbildner wie Cystein, Pyrophosphat und Glutathion gehemmt. Diese Hemmung unterbleibt oder wird aufgehoben in Anwesenheit zweiwertiger Schwermetallionen (Zn^{++}, Fe^{++}, Cu^{++}) (WARBURG und CHRISTIAN, 40). Die Muskelaldolase wird jedoch durch PO_4^{--} stark gehemmt, eine Eigenschaft, die sie mit der Phosphatase, Urease und Arginase gemein hat. In Collidin kann sich diese hemmende Wirkung des PO_4^{--} nicht bemerkbar machen (BRUNS, 4).

Das pH - Optimum der ALD liegt als breites Maximum bei pH 7, 5 im Collidinpuffer, in dem die ALD ihre höchste Aktivität entfaltet (BRUNS, 4). Nach Angaben von SIBLEY und LEHNINGER (31) liegt das pH - Optimum der ALD im Veronalpuffer zwischen pH 8, 5 und 9, 0.

Nach BRUNS (4) liegt das Temperaturoptimum der Serumaldolase bei 46° C und dasjenige der Erythrocytenaldolase bei 50° C oder etwas höher. Diese Angaben stimmen mit denen von COOK und DOUNCE (9) überein, die diese hohen Werte dahin deuten, daß Proteine die ALD vor Denaturierung schützen.

Der Anteil der ALD am Nichthämoglobineiweiß menschlicher Blutzellen wird von BRUNS und KIRCHNER (6) mit 0, 2 % angegeben unter der Annahme, daß das Molekulargewicht 150000 beträgt.

Bei der Fructose - 1 - phosphataldolase (FPA) und der Fructose - 1, 6 - diphosphataldolase handelt es sich um zwei verschiedene Enzyme (LEUTHARDT und WOLF, 21). 1957 gelang es KALETTA - GMÜNDER u. a., (17), die FPA, die in der Leber und wahrscheinlich auch in der Niere vorkommt (WOLF und LEUTHARDT, 42), chromatographisch von der ALD zu trennen. Die FPA ist unter normalen Verhältnissen im Serum nicht nachweisbar.

Für die praktische Bestimmung der ALD - Aktivität ist ihre Haltbarkeit in den Serumproben von Bedeutung. Während BEISENHERZ u. a. (2) noch berichtet, daß mit einer Abnahme der Aktivität bei 4° C nicht zu rechnen ist, weisen SÜDHOF und WÖTZEL (36) darauf hin, daß bei 4° C der Verlust der ALD - Aktivität nur verlangsamt wird und in der Tiefkühltruhe am geringsten ist (Tabelle 3) :

Tabelle 3

Aktivitätsverlust der ALD in %

	nach 12 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.
bei Raumtemperatur	20 %	27 %	30 %
bei - 4° C	18 %	20 %	22 %

4. Übertritt der ALD ins Serum

Die Zellmembran verhindert weitgehend den Übertritt der in der Zelle vorhandenen Enzyme in den extrazellulären Raum. Dadurch besteht zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum ein hoher Konzentrationsgradient, dessen Aufrechterhaltung als aktive Leistung der Zelle angesehen wird. Die hormonelle Kontrolle der Membranfunktion zeigt sich im fördernden Einfluß von Insulin auf die Muskelzellpermeabilität für ALD (ZIERLER, 45) oder auch in der Steigerung des ALD-Spiegels von Ratten- und Kaninchenserum durch ACTH und Cortison (DRYFUS, SCHAPIRA und SCHAPIRA, 11).

Durch reversible und irreversible Veränderungen der Zellmembran kann es zum Austritt der Zellenzyme kommen und damit zu einem Anstieg von Fermentaktivitäten im Serum (HESS, 15).

Schon Sauerstoffmangel, wie er durch schwere körperliche Arbeit in der Muskulatur entstehen kann, kann zu einer Steigerung der Membranpermeabilität führen. OTTO, SCHMIDT und SCHMIDT (27) konnten durch Arbeitsversuche am Menschen zeigen, daß die im Serum vermehrt nachgewiesenen Enzyme aus der Muskulatur stammen. Dies gilt besonders auch für die ALD. Der Anstieg der ALD-Aktivität ist abhängig von der Dauer und dem Schweregrad der Belastung. Kurzfristige Belastungen führen häufig zu einer Depression der ALD-Aktivität, während längere Belastungen meist ein Ansteigen verursachen. Je nach dem Grad der Belastung wurde der Ausgangswert nach 1 bis 2 1/2 Stunden wieder erreicht.

Der Einfluß des Trainingszustandes auf die Aktivitätsänderungen der ALD wurde besonders auch von RICHTER und KONITZER (28) untersucht.

Doch sind die Ergebnisse dieser Versuche nur schwer beurteilbar (OTTO, SCHMIDT und SCHMIDT, 27), weil die Probanden sich sehr unterschiedlich verhielten.

Die Ausschüttung der ALD aus der Zelle geht mit einem Verlust der Zelle an ALD einher. So konnte ZIERLER (44) zeigen, daß durch elektrische Reizung eines intakten M. peroneus longus der Ratte in situ der gereizte Muskel im Vergleich zum ungereizten einen Enzymverlust um mehr als 10 % erfuhr.

5. Methodik der ALD - Bestimmung

Eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der ALD im Serum wurde entwickelt. Die wichtigsten sollen hier genannt werden.

MEYERHOF und LOHMANN (24) bestimmten den alkalihydrolysierbaren P der Triosephosphate. Auf einer Reaktion der Triosephosphate mit 2, 4-Dinitrophenylhydrazin beruht ein Verfahren von SIBLEY und LEHNINGER (31). Das Kondensationsprodukt der Triosen ergibt in Alkali eine rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 535 - 540 mμ. Nach einer Modifikation dieser Methode arbeitete BRUNS (4). Die Abänderungen betreffen Puffersystem und Wasserstoffionenkonzentration. Es handelt sich auch hierbei um einen Farbtest. WARBURG und CHRISTIAN (40) weisen auf einen zusammengesetzten, optischen Zymohexasetest hin, dessen Testlösung Hexosediphosphat, Zymohexase, Pyridinnucleotid, Arsensäure und das Protein des oxydierenden Gärungsfermentes enthält.

6. Der Hämoglobingehalt von Plasma und Serum und die Bedeutung der Hämolyse für Aktivitätsbestimmungen von Enzymen.

Wie BRUNS und KIRCHNER (6) zeigen konnten, enthalten die Erythrocyten des Hundes erheblich mehr ALD als das Serum. Sie stellten deshalb die Forderung auf, daß Seren frei von Hämolyse zu sein hätten.

Die Erythrocyten des Hundes sind sehr empfindlich und neigen leicht zur Hämolyse. SCHÜTZLER und SIEGERT (30) bestimmten vergleichend den Hämoglobingehalt im Plasma und Serum des Hundes mit der Benzidinprobe von FURTH und CROSBY. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß

Serum (Hb = 140, 6 $\pm$ 64, 6γ/ml) hochsignifikant mehr Hämoglobin enthält als Plasma (Hb = 23, 1 $\pm$ 9, 6γ/ml). Diese höheren Hämoglobinmengen im Serum im Vergleich zum Plasma werden als Folge des Gerinnungsvorganges gedeutet.

Die Auswirkung der Hämolyse auf die LDH - Aktivität (Lactat - Dehydrogenase) in Plasma und Serum wurde auch vergleichend geprüft. Serum enthielt signifikant höhere LDH - Aktivitäten als Plasma.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß auch ohne Sichtbarwerden einer Hämolyse rote Blutzellen geschädigt werden und dadurch die in den Erythrocyten enthaltenen Enzyme in das Serum bzw. Plasma ausströmen und dadurch höhere Enzymaktivitäten bewirken können.

7. ALD - Aktivität im Serum von Mensch und Hund

Der Normalwert der ALD im Serum des Menschen wird mit 3 - 8 E BRUNS /ml angegeben. Erfolgt die Bestimmung durch den UV-Test mit DPNH, so beträgt er für den erwachsenen Menschen 1 - 2, 5 Millieinheiten /ml. Doch bestehen beim Menschen vom Alter abhängige Unterschiede in der Aktivität der ALD im Serum.

MURALT und RICHTER (26) fanden bei etwa 50 % der normalen Neugeborenen Werte > 20 Millieinheiten (UV-Test mit DPNH). Die ermittelten Werte streuten stark und zeigten im ersten Triminon (1. - 12. Lebenswoche) ein unterschiedlich starkes Absinken (STAVE, 34). Auch FRIEDMANN und LAPAN (12) stellten bei bis 4 Tage alten Säuglingen 5-mal höhere ALD-Aktivitäten fest als bei Erwachsenen.

VETTER, GRIESCHE und MOCH (38) beobachteten bei Jugendlichen von 11 - 20 Jahren um ein Drittel höhere ALD-Werte als bei den folgenden Altersgruppen. Diese Autoren konnten weder eine signifikante Geschlechtsdifferenz noch signifikante jahreszeitliche Schwankungen beobachten. Doch waren die erheblichen tageszeitlichen Schwankungen der ALD - Aktivität (bis zu 40 %) bei ein und derselben Person auffallend. Im Durchschnitt lagen alle Aktivitätswerte nachts relativ hoch, gegen Mittag niedrig und morgens und abends zwischen diesen beiden Werten.

Die ALD wurde im Rahmen verschiedener Arbeiten auch im Serum des Hundes bestimmt. Doch ist die Zahl der einzelnen Bestimmungen gering und erfolgte nach verschiedenen Methoden. Deshalb ist auch der Vergleich der Ergebnisse schwierig (Tabelle 4).

Tabelle 4

Bestimmungen der ALD im Serum des Hundes

N	Alter	Methode	Werte	Einheiten	Autor
10	versch.	BRUNS	15 (12-22)	E Bruns/ml	BRUNS (5)
18	40 T. u. älter	Modifi. SIBLEY u. LEHNINGER	12,5 (8-16)	U /ml	GORET u. a. (14)
6	1-3 J.	UV-Test mit DPNH	19,3 $\pm$ 4,71	E Bruns/ml	SCHOLZ (29)
20	erw. Tiere	UV-Test mit DPNH	2 - 6	I.U./1000	SOMMER (33)

N = Zahl der untersuchten Hunde.

8. Die diagnostische Bedeutung der ALD

Bei verschiedenen Erkrankungen kommt es zu erhöhten Aldolase-aktivitäten im Serum.

Bei der Virus-Hepatitis des Menschen steigt die ALD regelmäßig zu hohen Werten an (GOHR, 13 und BRUNS und PULS, 7). Aber auch toxisch bedingte Leberschäden verursachen ein Ansteigen ihrer Aktivität, das aber bei der chronischen Hepatitis und der Leberzirrhose fehlt. Bei den anderen Lebererkrankungen sind die Werte nicht oder nur geringgradig erhöht (GOHR, 13 u. a.).

GORET u. a. (14) ermittelte bei der experimentell erzeugten Hepatitis contagiosa canis eine erhebliche Erhöhung der ALD im Serum von 13 - 16 U/ml auf 56 - 102 U/ml. Auch die Fructose - 1 - phosphataldolase ist bei der akuten Hepatitis des Hundes erhöht (DOLDER, 10).

Zur Diagnose des Herzinfarktes wird die ALD hinzugezogen, die 24 Stunden nach dem Eintreten des Infarktes die höchsten Aktivitäten zeigt (GOHR, 13). Auch beim Hund konnte durch Verschluß der Koronararterien mit Plastikperlen ein Ansteigen der ALD-Aktivität erzeugt werden (SIEGEL und BING, 32).

In einigen Fällen von Nephrosen des Menschen wurden von BRUNS und PULS (7) erhöhte ALD-Werte im Serum ermittelt. Bei mit Proteinurie einhergehenden Erkrankungen des Menschen konnte KLAUS (18) ALD im Harn nachweisen, wobei die im Urin ausgeschiedenen Werte 1/25 - 1/8 der Serumwerte betrugen.

Bei der Dystrophia musculorum progressiva Erb (Dmp) des Menschen wird neben der Kreatinphosphokinase (CPK) und anderen Enzymen auch die ALD bestimmt. Die höchsten ALD- und CPK-Aktivitäten sind zu Beginn der Erkrankung zu beobachten. Mit der Dauer der Erkrankung werden die Aktivitätserhöhungen geringer. Bei häufiger Kontrolle zeigt es sich, daß innerhalb kürzester Zeit starke Schwankungen der genannten Enzyme vorkommen. Für die Differenzialdiagnose der verschiedenen Formen der Dmp sind die Serumenzyme einschließlich der ALD und CPK nur beschränkt geeignet (HEYCK und LAUDAHN, 16).

Auch bei der Myositis und Dermatomyositis des Menschen ist die Aktivität der ALD im Serum erhöht (DRYFUS, SCHAPIRA und SCHAPIRA, 11). Der Enzymanstieg fehlt nach diesen Autoren bei Muskelerkrankungen nervöser Genese.

Nach BAKER und GOVAN (1) hat sich die Bestimmung der Serumaldolase zur Erkennung des Prostatakarzinoms bewährt und der Ermittlung der sauren Phosphatase als überlegen erwiesen. MERTEN und SOLBACH (22) konnten bei keiner Tumorerkrankung eine signifikante Erhöhung der ALD feststellen.

III. Eigene Untersuchungen

1. Methode

a) Grundlagen der Aldolasebestimmung

Der Nachweis vieler Enzyme erfolgt heute durch die Bestimmung ihrer Aktivität. Die Aktivität eines Enzyms ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der eine von ihm katalysierte Reaktion in der Zeiteinheit abläuft. Sie ist damit Ausdruck seiner Funktion und sagt nichts über seine Menge aus.

Die Enzymaktivität, unter definierten Standardbedingungen gemessen, wird in Standardeinheiten ausgedrückt. Durch die IUB (International Union of Biochemistry 1961) wird die internationale Enzymeinheit (international unit = I. U.) als die Enzymmenge definiert, die bei 25° C in 1 Minute 1 µ Mol Substrat umsetzt. Eine Millieinheit (m. U.) ist demnach 1/1000 I. U.

Der "optische Test", wie er von WARBURG und CHRISTIAN (40) entwickelt wurde, ist eine hochempfindliche Methode zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen. Sein Prinzip beruht auf der Tatsache, daß die reduzierten Phosphopyridinnucleotide (DPNH und TPNH) im Gegensatz zu ihren oxydierten Formen im Bereich von 340 - 366 mµ eine starke Lichtabsorption haben. Überall dort, wo diese Di- und Triphosphopyridinnucleotide als Cofermente wirken oder wo diese chemisch als Indikatorenzyme an ein Enzym unbekannter Aktivität gekoppelt werden können (zusammengesetzter optischer Test), ist ihre Oxydation oder Reduktion ein Maß für die zu messende Enzymaktivität. Gewöhnlich sind Indikator - und Hilfsreaktion der Reaktion, die ein Enzym unbekannter Aktivität katalysiert, nachgeschaltet.

Der zusammengesetzte optische Test findet Anwendung bei der Bestimmung der Aktivität der FDP-Aldolase.

DAP = Dihydroxyacetonphosphat
DPNH = reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
FDP = Fructose - 1, 6 - diphosphat
GAP = Glycerinaldehydphosphat
GDH = Glycerophosphat - Dehydrogenase
TIM = Triosephosphat - Isomerase

Die ALD katalysiert die Reaktion:

(1) FDP $\rightleftharpoons$ GAP + DAP

Diese beiden Triosen stehen miteinander durch die katalytische Wirkung der TIM im Gleichgewicht, das zu 95 - 96 % auf der Seite von DAP liegt und sich bei TIM-Überschuß sofort einstellt.

Um die Aktivität der ALD bestimmen zu können, ermittelt man die in der Zeiteinheit gebildeten Triosephosphate, indem man DAP in Anwesenheit von GDH mit DPNH hydriert:

(2) 2 DAP + 2 DPNH + $2H^+ \xrightleftharpoons{GDH}$ 2 α-Glycerophosphat + $2DPN^+$

((2) stellt die nachgeordnete Indikatorreaktion dar.)

Weil die Grundbedingung aller Aktivitätsbestimmungen eine Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration ist, ist die Abnahme von DPNH im Reaktionsgemisch pro Zeiteinheit proportional der gespaltenen Menge FDP, die wiederum proportional der Aldolaseaktivität ist.

Die Bestimmung der Aktivität der ALD im Serum erfolgte mit der Biochemica Aldolase-Test Combination (UV-Test mit DPNH) der Firma C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim. Weil die Bestimmungen genau auf der in der Testanweisung angegebenen Weise vorgenommen wurden, kann auf eine Beschreibung derselben verzichtet werden. Die ALD-Aktivität wird in m. U. /ml angegeben.

b) Entnahme der Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte hauptsächlich aus der V. cephalica antebrachii, gelegentlich auch aus der V. saphena parva. Dabei wurde Sorge getragen, daß das Blut möglichst im ununterbrochenen Strahl aus der Kanüle heraus- und an der Wandung des Auffanggefäßes entlangfloß, um eine schonende Behandlung der empfindlichen Blutkörperchen zu gewährleisten. Anschließend wurde das Blut bei 3000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugiert und zur Aufbewahrung vorbereitet.

c) Geräte

Das Pipettieren der Reagenzien erfolgte mit 0, 1, 0, 5, 1 und 2 ml

Enzympipetten mit ausgezogener Spitze. Die Untersuchungsansätze wurden laut Testanweisung bei 37° C inkubiert, und zwar in einem Ultra-Thermostaten. Die ALD-Aktivität wurde in einfachen Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 5 mm im Photometer ELKO II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen unter Verwendung des Filters S 38 E 57 gemessen.

Die Bestimmung der ALD-Aktivität erfolgt nach definierten Standardbedingungen, die eine Schichtdicke von 10 mm fordern. Weil aber das Volumen des Testansatzes zu klein ist, um die entsprechenden Küvetten für ELKO II ausreichend zu füllen, wurden 5 mm Küvetten verwendet. Die Extinktionsdifferenzen ΔE wurden mit 2 multipliziert.

Die Wasserstoffionenkonzentration des Collidinpuffers, die bei pH 7,4 liegen soll, wurde regelmäßig mit einem Potentiometer überprüft. Auf die peinliche Sauberkeit der Glasgeräte wurde geachtet.

2. Prüfung der Einflüsse, die auf die Bestimmung der ALD einwirken

a) Der methodische Fehler

Die für Aktivitätsmessungen verwendeten Geräte haben einen Einfluß auf das Messergebnis, der in seiner Gesamtheit als methodischer Meßfehler bezeichnet wird. Zu seiner Bestimmung wurde in Serumproben von 7 Hunden die ALD-Aktivität je 8-mal gemessen.

Tabelle 5

Ermittlung des methodischen Meßfehlers in m. U. /ml

			Mittelwert jeder Probe
Beagle,	7 Mon.	w.	9,57
DSH,	2 J.	m.	11,39
Bast.,	3 J.	w.	9,81
Bast.,	3 J.	m.	6,54
SH.,	9 J.	m.	5,70
Bast.,	4 J.	m.	7,58
Bast.,	4 J.	w.	8,00

Aus den Berechnungen ergab sich ein mittlerer methodischer Fehler von $\pm$ 6,35 %.

b) Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der ALD ist abhängig von der Temperatur, bei der die Serumproben aufbewahrt werden. Weil es oft nicht möglich war, die anfallenden Serumproben sofort zu verarbeiten, wurden Untersuchungen vorgenommen, um die günstigste Aufbewahrungstemperatur zu ermitteln. Es wurde die Aktivitätskonstanz bei Zimmertemperatur (20° C), im Kühlschrank bei 4° C und in der Gefriertruhe bei -20° C geprüft (Tabelle 6).

Tabelle 6

Haltbarkeit der ALD im Serum : in m. U. /ml

SH. Bast. 4 J. m.			SH. Bast. 3 J. m.	
Stunden	4° C	20° C	Tage	-20° C
0	7, 67	7, 67	0	5, 99
2	6, 27	7, 48	2	6, 35
3	6, 73	6, 78	4	6, 83
4	7, 30	6, 31	6	6, 08
5	5, 94	5, 85	8	5, 70
6	5, 70	5, 14	10	5, 80
7	6, 62	4, 77		
8	5, 38	5, 28		
12	6, 59	4, 91		
24	6, 55	4, 86		

Noch zahlreiche weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Zimmertemperatur schon nach 5 Stunden mit einem Aktivitätsverlust von etwa 20 % zu rechnen ist, der sich nach 12 Stunden auf etwa 36 % steigert. Der Aktivitätsverlust liegt nach diesen Untersuchungen höher als von SÜDHOF und WÖTZEL (36) angegeben. Auch bei 4° C ist eine längere Aufbewahrung der Serumproben nicht möglich, weil bei dieser Temperatur neben einem Abfall der Aktivität zwischendurch wieder Steigerungen der ALD-Aktivität beobachtet wurden. Deshalb wurden alle Proben, die erst am nächsten Tag oder später untersucht werden konnten, in der Gefriertruhe eingefroren, weil hierdurch am sichersten mit der Erhaltung der Aktivität gerechnet werden konnte.

Das Auftauen der eingefrorenen Serumproben geschah langsam bei Zimmertemperatur. Gelegentlich wurden danach im Serum kleine weiße Flöckchen beobachtet. Auf Anfrage bei der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, wurde mitgeteilt, daß die nach dem Einfrieren und Wieder-Auftauen zu beobachtenden Flocken im allgemeinen aus denaturiertem Eiweiß bestehen. Um zu verhindern, daß diese Flöckchen das Meßergebnis beeinflussen, wurden die Seren, soweit ihre Menge es zuließ, gefiltert. Es konnte festgestellt werden, daß das Filtrieren der Serumproben keinen Einfluß auf ihre Aldolaseaktivität hat.

c) Einfluß der Hämolyse auf die Aldolaseaktivität

Auf den Hämoglobingehalt von Serumproben wurde schon im allgemeinen Teil dieser Arbeit hingewiesen.

Um einen Überblick zu erhalten, wurde in einer größeren Zahl von Serumproben der Hämoglobingehalt mit dem Cyanhämiglobin-Reagenz ASID bestimmt. Das Prinzip dieser Untersuchungsmethode beruht darauf, daß Hämoglobin unter der Einwirkung einer Transformationslösung quantitativ in Hämiglobincyanid, einem gegen äußere Einflüsse weitgehend stabilen Farbstoff, umgewandelt wird. Dieser Farbstoff wurde in ELKO II, Carl ZEISS, mit dem Filter Hg 546 nm gemessen und die ermittelten Werte mit dem Faktor 38, 59 multipliziert.

Der Transformationslösung (5 ml) wurde die 10-fache Menge, 0, 2 ml, Serum (Testanweisung 0, 02 ml Vollblut) zugesetzt, weil 0, 02 ml Serum nie eine ablesbare Extinktion bewirken konnten. Die ermittelten Werte wurden anschließend durch 10 geteilt. Tabelle 7 zeigt den Hämoglobingehalt einiger Serumproben:

Tabelle 7

	ALD m. U. /ml	Hb g /%
1.	7, 51	0, 034
2.	7, 69	0, 027
3.	15, 97	0, 015
4.	8, 33	0, 011
5.	7, 43	0, 023
6.	8, 41	0, 027

Um aber abzuklären, inwieweit Hämolyse die ALD-Aktivität zu beeinflussen vermag, wurde in Untersuchungsproben der Hämoglobingehalt und die ALD-Aktivität ermittelt. Dann wurden diesen Proben mechanisch zerstörte Blutkörperchen zugesetzt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und die beiden Messungen wiederholt. Beide Wertepaare werden in Tabelle 8 verglichen.

Tabelle 8

Einfluß der Hämolyse auf die ALD-Aktivität

ALD in m. U. / ml, Hb in g%

			Hb	ALD	Hb	ALD
Jagdh.	3 J.	m.	0, 026	8, 98	0, 042	12, 33
Bast.	7 Mon.	m.	-x)	11, 88	0, 38	14, 04
Bast.	3 J.	w.	-x)	6, 33	0, 069	7, 11
Bast.	3 J.	w.	-x)	4, 30	0, 092	5, 14
Bast.	9 Mon.	w.	0, 034	8, 77	0, 061	11, 35
Beagle	1 J.	w.	0, 026	5, 33	0, 042	6, 10
Beagle	1 J.	m.	0, 027	6, 96	0, 054	7, 56

x) Hämoglobin war nicht nachweisbar.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß:

1. der Hämoglobingehalt der Serumproben bei 0, 034 g % lag,
2. die auf diese Weise erzeugte Hämolyse einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der ALD-Aktivität bewirkt hat,
3. mit den höheren Hämoglobinwerten die ALD-Aktivität anstieg, daß aber der Anstieg nicht proportional verlief,
4. auch schon vor dem Eintreten einer sichtbaren Hämolyse Blutkörperchen zerstört werden und dadurch die ALD-Aktivität der Serumproben ansteigt.

Diese Untersuchungen bestätigen die Forderung (BRUNS, 4), daß Seren, die auch nur eine leichte Hämolyse erkennen lassen, zu verwerfen sind. Um den Hämoglobingehalt der Serumproben möglichst gering zu halten, ist es notwendig, die mechanische Beanspruchung des Blutes gering zu halten und das Blut schnell nach der Entnahme zu zentrifugieren.

d) Verdünnungen

Schon zu Beginn der Untersuchungen zeigte es sich, daß manche Seren, besonders die junger Hunde, hohe ALD-Aktivitäten besitzen.

Laut Arbeitsanweisung sollen Extinktionsdifferenzen (Δ E) von $\Delta E > 0,2500$ (dies entspricht $\Delta E > 0,1250$ bei Verwendung von 5 mm Küvetten) vermieden werden.

Infolge des raschen Substratumsatzes sind die biochemischen Reaktionen frühzeitig beendet. Die Forderung nach einem linearen Reaktionsablauf ist dadurch nicht mehr gewährleistet. Deshalb werden durch Anwendung von Serumverdünnungen die Enzymaktivitäten gedämpft. Allerdings muß bei der Berechnung der Verdünnungsgrad berücksichtigt werden.

Die Testanweisung empfielt eine Verdünnung der Seren 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung. Weil aber bei der Verwendung von 5 mm Küvetten der Δ E - Wert bei diesem Verdünnungsgrad nicht mit 10, sondern mit 20 multipliziert werden muß, wurde von diesem Verdünnungsgrad Abstand genommen. Der methodische Fehler würde dadurch vervielfacht werden. In der Folge wurde die Verdünnung der Seren 1 : 2 mit tridestilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung verglichen und die Genauigkeit der praktischen Verdünnungsarbeit an Seren, die nicht zu verdünnt werden brauchten, geprüft (Tabelle 9).

Tabelle 9

Verdünnungen 1 : 2 mit tridestilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung : in m. U. /ml

Serum	Aqua dest.	phys. NaCl
6, 26	7, 48	8, 42
9, 26	9, 36	7, 74
11, 23	11, 79	11, 23
6, 55	6, 92	--
10, 82	11, 04	11, 98
5, 88	6, 02	6, 88
8, 51	9, 46	9, 97

Auffallend war es, daß die Verdünnungen höhere Aktivitäten enthielten als die unverdünnten Seren. In Anbetracht auch der Ergebnisse von WÜRZNER (43) wurden die Seren 1 : 2 mit tridestilliertem Wasser verdünnt, weil hierdurch die besten Ergebnisse erwartet wurden.

3. Prüfung der Einflüsse, die auf die ALD-Aktivität im Serum einwirken

a) Auswirkung körperlicher Belastung auf die ALD-Aktivität im Serum

Wie aus der Literatur (OTTO, SCHMIDT und SCHMIDT, 27 u. a.) hervorgeht, führt körperliche Arbeit beim Menschen zu Veränderungen der ALD-Aktivität im Serum. Es wurde nun untersucht, ob die ALD sich im Serum des Hundes ähnlich verhält wie beim Menschen.

Sechs Hunde wurden 1/2 Stunde lang im Dauerlauf an der Leine geführt, zwei Hunde liefen 10 Minuten lang bei einer Geschwindigkeit von 30 km/Std. vor oder hinter einem fahrenden Auto her (1 und 2 der Tabelle 10). Vor und nach der Belastung wurden Blutproben abgenommen. Die ermittelten Werte werden in Tabelle 10 miteinander verglichen.

Die auf diese Weise durchgeführte körperliche Belastung verursachte eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Steigerung der ALD-Aktivität um durchschnittlich 28 %.

Tabelle 10

Änderung der ALD-Aktivität im Serum durch körperliche Belastung : ALD in m. U. /ml

			vorher	nachher
Dtsch. Stichelh.	3 J.	m.	6, 25	8, 98
Dtsch. Stichelh.	7 J.	w.	4, 21	5, 33
Pudel	8 J.	w.	6, 27	9, 03
Bast.	5 J.	w.	4, 11	5, 50
Beagle	7 Mon.	w.	9, 45	10, 29
Beagle	7 Mon.	m.	8, 78	11, 23
Bast.	6 Mon.	m.	11, 23	13, 47

Für die diagnostische Enzymbestimmung ist es nun wichtig zu wissen, wie lange es dauert, bis nach der Belastung der Ausgangswert, der vor der Belastung ermittelt wurde, sich wieder einstellt. Aus diesem Grunde wurde das Verhalten der ALD-Aktivität im Serum von 3 Hunden über 5 Stunden verfolgt (Tabelle 11). Die Bestimmungen erfolgten in Form von Doppelbestimmungen.

Tabelle 11

Das Verhalten der ALD-Aktivität nach körperlicher Belastung

ALD in m. U. / ml

	Dtsch. Stichelh. 7 J. w.	Bast. 5 J. w.	Bast. 5 J. m.
vorher	4, 21	4, 11	4, 11
nachher	5, 33	5, 50	5, 14
nach 1 1/2 Std.	5, 70	5, 33	5, 58
nach 3 Std.	6, 55	5, 56	5, 05
nach 5 Std.	6, 83	5, 28	4, 21

Die ALD-Aktivität verhielt sich in der Beobachtungszeit von 5 Stunden bei allen drei Hunden verschieden. Beim 5-jährigen Bastardrüden ging die Aktivität in der Erholungsphase auf den Ausgangswert zurück. Bei der Jagdhündin stiegen die Werte weiter an. Bei der 5-jährigen Bastardhündin lagen die in der Erholungsphase ermittelten Werte innerhalb $\pm$ 2, 47 %. Der Ausgangswert stellte sich nicht wieder ein. Es wurde bei diesen Untersuchungen darauf geachtet, daß die Hunde sich ruhig verhielten.

Diese Versuche zeigen, daß nach einer körperlichen Belastung damit zu rechnen ist, daß die ALD-Aktivität länger als 5 Stunden erhöht bleiben kann.

b) Tageszeitliche Schwankungen

Es wurden von einigen Hunden verschiedenen Alters und Geschlechtes zu verschiedenen Tageszeiten Blutproben entnommen und die Aktivität der ALD gemessen, um zu prüfen, ob tageszeitliche Schwankungen der Aktivität nachzuweisen sind (Tabelle 12).

Tabelle 12

ALD-Aktivität während einer Beobachtungszeit von 24 Stunden

Tageszeit	Bast. 6 J. w	Bast. 11 Mon. w.	Bast. 11 Mon. w.	Bast. 1 J. m.	Bast. 6 J. w.	Bast. 9 Mon. w.
8 Uhr	6, 66	14, 83	8, 60	6, 23	4, 55	10, 32
13 Uhr	5, 97	16, 68	7, 51	5, 24	--	10, 23
17 Uhr	7, 69	15, 97	8, 33	6, 10	5, 07	10, 44
22 Uhr	7, 43	15, 39	8, 91	4, 84	4, 08	9, 89
8 Uhr	6, 62	15, 22	7, 99	5, 17	4, 71	9, 75

Um genaue Werte zu erhalten, wurden die Hunde möglichst ruhig gehalten und die Bestimmungen in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung dieser Untersuchungen ergab Tagesschwankungen bis zu $\pm$ 11, 36 %.

Auch bei der Bestimmung der ALD-Aktivität ein und desselben Hundes über eine längere Zeit sind Schwankungen zu beobachten. So wurde die ALD-Aktivität bei 2 Hunden 7 Wochen lang in regelmäßigen Abständen ermittelt (Tabelle 13) und Schwankungen bis $\pm$ 18, 63 % beobachtet.

Tabelle 13

ALD-Aktivität bei Hunden unter längerer Beobachtungsdauer

ALD in m. U. /ml

	Bast. 3 J. w.	Bast. 4 J. m.
10. 5.	5, 42	4, 49
18. 5.	4, 39	4, 11
24. 5.	4, 39	4, 21
30. 5.	5, 05	4, 96
28. 6.	5, 25	6, 55

4. Hundematerial

Das Hundematerial, das zur Bestimmung der ALD-Aktivität im Serum verwendet wurde, zeichnet sich durch eine vielseitige Zusammensetzung aus. So erfolgte die Bestimmung der ALD in ganzen Würfen. Neben Klinikhunden

wurden Hunde des Bundesgesundheitsamtes und Polizeihunde, die sich in der Ausbildung befanden, zu Bestimmungen hinzugezogen. Weiterhin wurde bei Patienten der Poliklinik die ALD-Aktivität im Serum bestimmt, bei denen durch Prüfung des Blutbildes und Blutsenkung eine Erkrankung der inneren Organe nicht festgestellt werden konnte oder bei denen anzunehmen war, daß ihre Leiden keinen Einfluß auf die ALD-Aktivität hatte. Die Bestimmungen erfolgten bei: Keratitis, Hornhautdefekten, Zahnstein, Zahnextraktionen, kleinen Hautverletzungen, Warzen, gelegentlich bei Epuliden und kleinen Hauttumoren, Afterkrallen. Es sei noch zu erwähnen, daß bei chirurgischen Eingriffen die Blutentnahme stets vor der lokalen oder allgemeinen Anästhesierung erfolgte.

5. Ergebnisse

Die ALD-Aktivität bei Hunden verschiedener Rasse, sowie verschiedenen Alters und Geschlechts

Die Aldolaseaktivität wurde im Serum von 113 klinisch gesunden Hunden bestimmt und die ermittelten Werte wurden graphisch (Abb. 1) und tabellarisch (Tabellen 14 - 16) dargestellt.

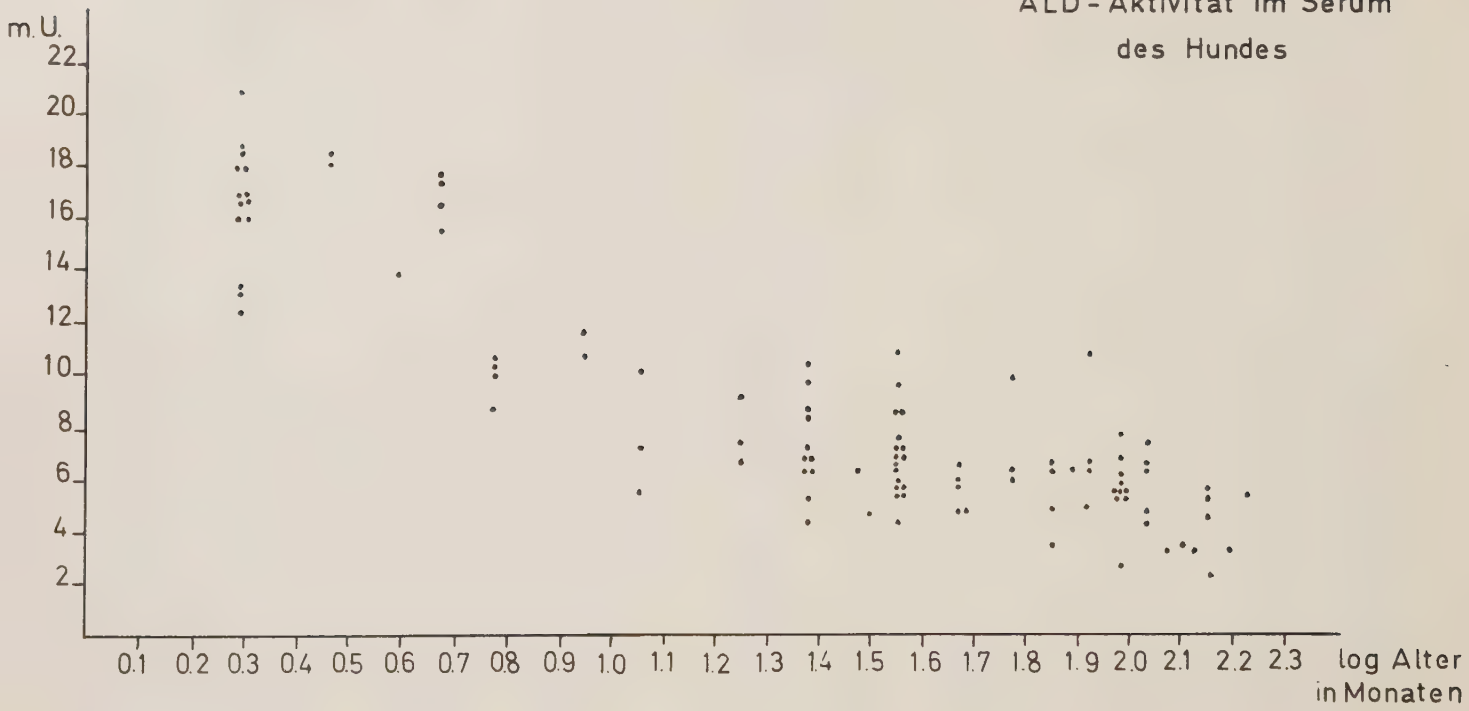
Schon zu Beginn der Untersuchungen zeigte es sich, daß die ALD-Aktivität vom Alter der Hunde abhängig ist. Mit dem Fortschreiten des Alters ist ein Abfall der Enzymaktivität zu beobachten. Um deutlich zu zeigen, daß der Abfall im ersten Lebensjahr besonders stark ist und mit dem Fortschreiten des Alters langsamer verläuft, um bei den über 10 Jahre alten Hunden eine Verstärkung zu erfahren, wurden die Werte in Abb. 1 halblogarithmisch dargestellt (Abzisse : log Alter, Jahre wurden in Monate umgerechnet; Ordinate : ALD-Aktivität in m. U. /ml).

Die ermittelten Werte wurden in drei Gruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe sind 32 Hunde bis zu einem Alter von einem Jahr zusammengefaßt. Die zweite und größte Gruppe wird von 72 ein bis neun Jahre alten Hunden gebildet. In die dritte Gruppe wurden die 10 Jahre alten und älteren Hunde eingeordnet.

Für jede Gruppe wurde gesondert die mittlere ALD-Aktivität, sowie die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (VK) in % berechnet.

Abb. 1

ALD - Aktivität im Serum des Hundes



Der Vergleich der mittleren Enzymaktivitäten zeigte hochsignifikante Differenzen ($p < 0,001$) der Gruppen untereinander. Diese Ergebnisse rechtfertigen die Unterteilung der Werte in drei Gruppen.

1. Hunde bis zu einem Jahr : $14,83 \pm 2,34$ m. U. / ml
   VK = 15,77 %

2. Hunde von 1 - 10 Jahren : $6,58 \pm 1,68$ m. U. / ml
   VK = 25,53 %

3. Hunde über 10 Jahre: $4,12 \pm 1,23$ m. U. / ml
   VK = 29,90 %

Es konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern noch zwischen den Rassen festgestellt werden.

Tabelle 14

Aktivitäten der Aldolase im Serum von Hunden bis zu einem Jahr: m.U. / ml

Dtsch. Dogge	w.	2 Mon.	16,47
Dtsch. Dogge	m.	2 Mon.	15,91
Dtsch. Dogge	m.	2 Mon.	13,10
Dtsch. Dogge	w.	2 Mon.	15,91
Dtsch. Dogge	w.	2 Mon.	16,38
SH. Bast.	m.	2 Mon.	13,38
SH. Bast.	w.	2 Mon.	12,63
SH. Bast.	w.	2 Mon.	18,62
SH. Bast.	m.	2 Mon.	18,81
SH. Bast.	w.	2 Mon.	17,87
Boxer	m.	2 Mon.	20,77
Boxer	m.	2 Mon.	18,25
Boxer	m.	2 Mon.	16,84
Boxer	m.	2 Mon.	16,84
Boxer	w.	2 Mon.	17,87
Boxer	w.	3 Mon.	18,43
Boxer	m.	4 Mon.	18,06
Pudel	m.	4 Mon.	13,90
SH. Bast.	m.	5 Mon.	17,61
SH. Bast.	m.	5 Mon.	16,66
SH. Bast.	m.	5 Mon.	15,53
SH. Bast.	m.	5 Mon.	15,52
SH. Bast.	m.	5 Mon.	17,40
Beagle	w.	6 Mon.	10,01
Beagle	m.	6 Mon.	10,29
Beagle	w.	6 Mon.	8,61
Teckel	m.	6 Mon.	10,71
SH.	m.	6 Mon.	15,91
SH.	m.	9 Mon.	11,51
Boxer	w.	9 Mon.	10,76
Teckel	m.	12 Mon.	7,25
Riesenschnauzer	m.	12 Mon.	10,01

Tabelle 15

Aktivitäten der Aldolase im Serum von Hunden im Alter von einem bis zu neun Jahren : in m. U. / ml

DSH.	m.	2 Jahre	6,08
DSH.	m.	2 Jahre	6,41
SH.	m.	2 Jahre	7,25
DSH.	m.	2 Jahre	6,45
Boxer	m.	2 Jahre	7,25
SH.	m.	2 Jahre	10,70
DSH.	m.	2 Jahre	8,47
SH.	m.	2 Jahre	10,34
SH.	m.	2 Jahre	11,27
Rottweiler	m.	2 Jahre	9,54
SH.	m.	2 Jahre	9,26
Zw. Schnauzer	w.	2 Jahre	6,17
Pudel	m.	2 Jahre	6,83
SH. Bast.	m.	2 Jahre	5,24
SH. Bast.	m.	2 Jahre	6,17
SH. Bast.	w.	2 Jahre	6,83
SH. Bast.	m.	2 Jahre	4,98
SH. Bast.	w.	2 Jahre	6,55
SH. Bast.	w.	2 Jahre	4,77
SH. Bast.	w.	3 Jahre	5,14
SH. Bast.	w.	3 Jahre	7,11
SH. Bast.	w.	3 Jahre	7,20
SH. Bast.	m.	3 Jahre	6,55
SH. Bast.	m.	3 Jahre	5,52
SH. Bast.	w.	3 Jahre	4,30
SH. Bast.	w.	3 Jahre	6,36
SH. Bast.	w.	3 Jahre	8,46
SH. Bast.	w.	3 Jahre	5,33
SH. Bast.	m.	3 Jahre	7,63
SH. Bast.	m.	3 Jahre	6,92
SH.	m.	3 Jahre	7,67
Collie	m.	3 Jahre	10,90

SH. Bast.	w.	3 Jahre	9,64
SH. Bast.	m.	3 Jahre	8,56
SH. Bast.	m.	3 Jahre	6,03
Dtsch. Stichelhaar	m.	3 Jahre	6,35
Teckel	w.	3 Jahre	5,70
Boxer	m.	3 Jahre	5,52
SH.	m.	3 Jahre	4,77
DSH.	m.	4 Jahre	5,94
Teckel	m.	4 Jahre	6,55
Riesenschnauzer	m.	4 Jahre	5,61
Boxer	w.	4 Jahre	4,82
SH.	m.	4 Jahre	4,49
SH.	m.	5 Jahre	5,99
SH. Bast.	w.	5 Jahre	9,92
SH.	m.	5 Jahre	6,36
Teckel	m.	6 Jahre	4,96
Bastard	m.	6 Jahre	6,22
Afghane	m.	6 Jahre	3,32
SH. Bast.	w.	6 Jahre	6,64
Neufundl.	m.	7 Jahre	10,57
SH.	w.	7 Jahre	7,39
Dtsch. Vorstehh.	w.	7 Jahre	6,27
SH.	m.	7 Jahre	5,80
SH.	m.	8 Jahre	5,94
SH.	m.	8 Jahre	5,64
Pudel	w.	8 Jahre	6,27
SH.	w.	8 Jahre	7,60
Bast.	m.	8 Jahre	5,14
SH.	m.	8 Jahre	2,62
Boxer	w.	8 Jahre	5,05
Boxer	w.	8 Jahre	6,55
Airedale	m.	8 Jahre	5,61
Pudel	w.	8 Jahre	6,08
Cherry Blue	m.	8 Jahre	5,33
Irish Setter	w.	9 Jahre	4,35

Spaniel	w.	9 Jahre	5,94
SH.	w.	9 Jahre	6,31
SH.	m.	9 Jahre	6,36
Barsoi	w.	9 Jahre	4,68
SH.	m.	9 Jahre	7,48

Tabelle 16

Aktivitäten der Aldolase im Serum von Hunden im Alter von 10 bis 14 Jahren : in m.U. / ml

Pudel	w.	10 Jahre	3,46
Teckel	m.	11 Jahre	3,74
SH.	m.	11 Jahre	3,06
Boxer	m.	12 Jahre	3,37
Chow	m.	12 Jahre	4,61
SH.	w.	12 Jahre	5,52
Boxer	m.	12 Jahre	5,66
SH.	m.	12 Jahre	2,15
Bast.	w.	14 Jahre	5,38

6. Diskussion

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, ist die Aktivität der ALD im Serum abhängig vom Alter der Hunde. So ist die ALD-Aktivität bei Hunden bis zu einem Jahr signifikant höher als bei den folgenden Altersgruppen.

Junge Individuen zeigen häufig ein anderes biochemisches Verhalten der im Serum nachweisbaren Substanzen als erwachsene. So ist zum Beispiel die Aktivität der MDH (Malat - Dehydrogenase) im Serum bei bis zu einem Jahr alten Hunden signifikant höher als bei den über ein Jahr alten Hunden (WÜRZNER, 43).

Doppelbestimmungen und Vergleichsuntersuchungen haben gezeigt, daß die hohen ALD-Aktivitäten junger Hunde nicht auf einen methodischen Fehler zurückzuführen sind. Die Ursache für dieses Phänomen ist also im Junghund selber zu suchen.

Weil auch beim Säugling höhere Serumaktivitäten der glycolytischen Enzyme festzustellen sind, beschäftigten sich einige Autoren (FRIEDMANN und LAPAN, 12, STAVE, 34 u. a.) mit dieser Erscheinung. So wird die hohe Zellpermeabilität der Neugeborenen auch für hochmolekulare Eiweißkörper (STAVE, 34), die im Vergleich zum intratauterinen Leben erhöhte körperliche Aktivität der Neugeborenen (FRIEDMANN und LAPAN, 12) und die hohe Aktivität der Nebennierenrinde, die beim Säugling im Verhältnis zum erwachsenen Menschen 20-mal größer ist (BRENNER, 3), als Ursachen diskutiert.

Inwieweit diese Verhältnisse auch für den Hund zutreffen, ist im Rahmen dieser Arbeit schwer beurteilbar. Doch es ist anzunehmen, daß beim Junghund die ALD-Aktivität durch ähnliche Faktoren beeinflußt wird.

Mit dem Fortschreiten des Alters fällt die ALD-Aktivität im Serum ab. Der Versuch, diesen Abfall durch die Berechnung einer Funktion zu charakterisieren, mißlang. Die ermittelte Punkteschar ließ durch die starke Streuung der Werte innerhalb aller Altersgruppen den Verlauf einer Kurve nicht erkennen. So hätte die halblogarithmische Darstellung der Werte einen linearen Abfall zeigen müssen, damit eine Exponentialfunktion aufzustellen gewesen wäre. Es ist aber in Erwägung zu ziehen, daß die Zahl der

Bestimmungen noch nicht ausreicht, um eine funktionelle Aussage über die Abhängigkeit von Alter und ALD-Aktivität machen zu können.

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, so ist die ALD-Aktivität sowohl im Ablauf eines Tages als auch über längere Zeiträume hin Schwankungen unterworfen. So wurden Tagesschwankungen bis zu $\pm$ 11,36 % beobachtet, obwohl darauf geachtet wurde, daß die Hunde keiner besonderen Belastung ausgesetzt waren. Als Belastung ist jede Beanspruchung anzusehen, die die normale körperliche Aktivität übersteigt. Hierbei bedeutet allerdings "normal" für jeden Hund etwas anderes, was sich schon darin zeigt, daß die Tagesschwankungen der ALD individuell verschieden sind. Nach OTTO, SCHMIDT und SCHMIDT (27) stammt die ALD des Serums hauptsächlich aus der Muskulatur, so daß die Tagesschwankungen durch die normale körperliche Aktivität bedingt werden.

Das halbstündige Führen der Hunde im Dauerlauf ist nach der gegebenen Definition eine Belastung und führte bei den Hunden einheitlich zu signifikanter Steigerung der ALD-Aktivität um durchschnittlich 28 %. Die Versuche wurden in der Absicht durchgeführt, um zu prüfen, ob körperliche Belastung überhaupt Einfluß auf die ALD im Serum hat. Differenziertere Versuche werden aber erst noch zeigen müssen, ob kürzere oder längere Belastung und Trainingszustand ein anderes Verhalten der ALD-Aktivität zu verursachen vermögen.

Die Enzymaktivität der ALD im Serum wird nach körperlicher Belastung durch gegenläufige und verschiedene Prozesse bestimmt. Es kommt zu Enzymentweichungen aus der arbeitenden Muskelzelle, hauptsächlich durch Permeabilitätsänderung der Zellwand während der körperlichen Belastung. Im Plasma kommt es zu Veränderungen der ALD-Aktivität durch Einwirkung aktivierender und inaktivierender Substanzen. Das Ausmaß dieser Prozesse ist individuell verschieden. Die drei Versuche, bei denen die ALD-Aktivität nach körperlicher Belastung über 5 Stunden verfolgt wurde, haben gezeigt, daß das Verhalten der Aldolase sehr unterschiedlich ist. Deshalb muß auch gefordert werden, daß vor diagnostischer ALD-Bestimmung jede körperliche Belastung zu vermeiden ist.

Körperliche Belastung, tageszeitliche individuelle Schwankungen, Hämolysegrad der Serumproben und Verdünnungsfehler sind Faktoren,

die für die starke Streuung der Werte verantwortlich gemacht werden können. Daß der Variationskoeffizient der dritten Gruppe größer ist als der der zweiten Gruppe, ist wohl hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß durch die geringe Zahl der Bestimmungen der Zufall der Verteilung eine große Bedeutung zukommt. Für einige hohe Werte älterer Hunde, die ermittelt wurden, muß angenommen werden, daß diese durch latente Organopathien zustande gekommen sind.

Wird nun die ALD zur Abklärung eines pathologischen Bildes hinzugezogen, so fragt es sich, ob die Standardabweichung, wie sie für die einzelnen Gruppen bestimmt wurde, ausreicht, um den normalen gegen den pathologischen Bereich abzugrenzen. Die folgenden Betrachtungen gelten für die über ein Jahr alten Hunde.

Hauptsächlich im Alter von 2 und 3 Jahren wird die Standardabweichung + s überschritten, während dies bei den älteren Jahrgängen nur ganz vereinzelt geschieht. Deshalb kann bei den 2 bis 3-jährigen Hunden + 2s noch als normal bezeichnet werden. Unter der Berücksichtigung aber, daß mit fortschreitendem Alter die ALD-Aktivität eine abfallende Tendenz zeigt, kann diese Erweiterung des Normalbereiches für die über 3 Jahre alten Hunde nicht angenommen werden, weil die meisten Werte gut innerhalb von $\pm$ s liegen.

IV. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein allgemeiner Überblick über die Herkunft, biochemischen Eigenschaften und die diagnostische Bedeutung der Aldolase gegeben.

Im zweiten Teil werden die Einflüsse untersucht, die auf die Aktivität der Aldolase einwirken und die ALD-Aktivität im Serum von 113 klinisch gesunden Hunden verschiedenen Alters und Geschlechtes und verschiedener Rasse bestimmt. Als Reagenz wurde die Biochemica Aldolase-Test Combination der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, verwendet.

1. Die aus den Untersuchungen resultierenden Mittelwerte lauten:
   a) Hunde bis zu einem Jahr : $14,83 \pm 2,34$ m. U. /ml
   b) Hunde von 1 - 9 Jahren : $6,58 \pm 1,68$ m. U. /ml
   c) Hunde über 10 Jahre : $4,12 \pm 1,23$ m. U. /ml
2. Zwischen allen drei Gruppen besteht ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Unterschied.
3. Der methodische Fehler beträgt $\pm 6,35$ %.
4. Die Erhaltung der Aktivitätskonstanz der Serumproben wird durch Einfrieren gewährleistet.
5. In den Serumproben, frei von sichtbarer Hämolyse, wurde mit dem Cyanhämiglobin-Reagenz ASID ein Hämoglobingehalt bis zu 0,035 g % ermittelt.
6. Hämolytische Seren enthalten signifikant ($p < 0,05$) höhere ALD-Aktivitäten.
7. Körperliche Belastung bewirkt eine Erhöhung der ALD-Aktivität im Serum.
8. Es wurden Tagesschwankungen bis $\pm 11,36$ % beobachtet.
9. Die Ursachen für die hohen ALD-Aktivitäten junger Hunde, der Einfluß der körperlichen Belastung und der tageszeitlichen Schwankungen auf die ALD-Aktivität werden diskutiert.

V. Literaturverzeichnis

1. Baker, R., Govan, D. — The effect of hormonal therapy of prostaticcancer on serum aldolase. Cancer Res., 13, 141, 1953

2. Beisenherz, G. u.a. — Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd- Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat - Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturfosch. 8b, 555, 1953

3. Brenner, M. — Studies on the involution of the fetal cortex of the adrenal gland (zit. nach 12) Amer. J. Path., 16, 787, 1940

4. Bruns, F. — Chemische, physiologische und klinische Studien über die Aldolase des Blutplasmas und der roten Blutzellen. Med. Habil.-Schrift, Düsseldorf 1953

5. Bruns, F. — Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase. Biochem. Zschr., 325, 156, 1953/54

6. Bruns, F., Kirchner, Chr. — Über die Aldolaseaktivität von Serum und roten Blutzellen verschiedener Spezies. Naturwiss., 41, 141, 1954

7. Bruns, F., Puls, W. — Die Aktivität der Serumaldolase bei Erkrankungen der Leber. Klin. Wschr., 32, 656, 1954

8. Bücher, Th., Schmidt, E., Schmidt, F.W. — (zit. nach 15)

9. Cook, J.L., Dounce, A.L. — Determination of serum aldolase. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 87, 349, 1954

10. Dolder, K. — Die Brauchbarkeit der 1 - Phosphofructaldolase-Aktivitätsmessung im Blutserum zur Diagnose von Lebererkrankungen beim Hunde. Vet.-med. Diss. Zürich 1959

11. Dryfus, J.C., Schapira, G., Schapira, F.
Serum enzymes in the physiopathology of muscle.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 235, 1958

12. Friedmann, M.M., Lapan, B.
Serum aldolase in neonatal period: Including a colorimetric determination of aldolase by standardisation with dioxyacetone.
J. Lab. and Clin. Med. 51, 745, 1958

13. Gohr, H.
Klinische Erfahrungen mit der Bestimmung von Transaminasen, Aldolasen, Dehydrogenasen und anderen modernen Serum-Fermentreaktionen unter besonderer Berücksichtigung von Leberkrankheiten und Herzinfarkt.
Zschr. inn. Med. 17, 535, 1962

14. Goret, P., u.a.
Essai de diagnostic expérimental de l'hépatite contagieuse du chien basé sur l'activité des enzymes seriques.
Recueil méd. vét. 138, 1035, 1962

15. Hess, B.
Enzyme im Blutplasma.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1962

16. Heyck, H., Laudahn, G.
Enzymaktivitätsveränderungen im Muskel bei Dystrophia musculorum progressiva. 3. Mitteilung.
Klin. Wschr. 41, 905, 1963

17. Kaletta-Gmünder, U., Wolf, H.P., Leuthardt, F.
Chromatographische Trennung von 1-Phosphofructaldolase Diphosphofructaldolase der Leber.
Helvet. chim. acta. 40, 1027, 1957

18. Klaus, D.
Renale Fermentausscheidung der Proteinurie.
Klin. Wschr. 36, 207, 1958

19. Laudahn, G., Heyck, H.
Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien.
Klin. Wschr. 41, 493, 1963

20. Leuthardt, F.
Lehrbuch der physiologischen Chemie 15. Aufl.
Walter de Gruyter, Berlin, 1963

21. Leuthardt, F., Wolf, H. P. — Über die Spez. der Aldolasen
Helvet. chim. acta. 37, 1734, 1954

22. Merten, R., Solbach, H.-G. — Enzymverteilungsmuster des glycolytischen Systems und Citronensäurezyklus im Plasma Krebskranker.
Klin. Wschr. 39, 222, 1961

23. Meyerhof, O., Junowicz-Kocholaty, R. — The equilibria of isomerase and aldolase and the problem of the phosphorylation of glycerinaldehyde-phosphate.
J. Biol. Chem. 149, 71, 1943

24. Meyerhof, O., Lohmann, K. — Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure.
Biochem. Zschr. 271, 89, 1934

25. Meyerhof, O., Lohmann, K. — Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. 2. Verbreitung der Zymohexase.
Biochem. Zschr. 273, 413, 1934

26. Muralt, G. v., Richter, R. H. H. — Die Aktivität der Serumaldolase bei Neugeborenen.
Gynaecologia, 151, 124, 1961

27. Otto, P., Schmidt, E., Schmidt, F. W. — Enzymspiegel im Serum bei körperlicher Arbeit und ambulanten Patienten.
Klin. Wschr. 42, 75, 1964

28. Richter, K., Konitzer, K. — Veränderung der Aldolaseaktivität im Blutserum bei Muskelarbeit.
Klin. Wschr. 38, 998, 1960

29. Scholz, M. — Untersuchungen zur Leberschädigung durch 1-Methyl-delta-1-androstenolon-17-acetat und Thioacetamid beim Hund.
Vet.-med. Diss. Berlin FU, 1963

30. Schützler, G., Siegert, M. — Mikrobestimmung von Hämoglobin im Hinblick auf die Fermentdiagnostik im Serum und Plasma von Hunden und Pferden.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 76, 224, 1963

31. Sibley, J.A., Lehninger, A.L. Determination of aldolase in animal tissues.
J.. Biol. Chem. 177, 859, 1949

32. Siegel, A., Bing, R.J. Plasma enzyme activity in myocardial infarction in dog and man
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 91, 604, 1956

33. Sommer, H. Grundlagen, Bedeutung und Grenzen der Enzymdiagnostik bei Herz- und Lebererkrankungen.
Kleintier-Praxis, 10, 233, 1965

34. Stave, U. Transaminasen und glykolytische Fermente im Serum von Neugeborenen, Säuglingen und Kindern.
Zschr. Kinderhk. 81, 472, 1958

35. Stumpf, P.K. Carbohydrate metabolism in higher plants. 1. Pea aldolase.
J. Biol. Chem. 176, 233, 1948

36. Südhof, H., Wötzel, E. Über die Haltbarkeit von zur Enzymbestimmung vorgesehenen Serumproben.
Klin. Wschr. 38, 1165, 1960

37. Taylor, J.F., Green, A.A., Cori, G.T. Cristalline aldolase.
J. Biol. Chem. 173, 591, 1948

38. Vetter, K., Griesche, H., Moch, K. Serumfermente und ihr Verhalten unter physiologischen Bedingungen.
Zschr. inn. Med. 16, 395, 1961

39. Warburg, O., Christian, W. Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungs-Co-Ferment.
Biochem. Zschr. 286, 81, 1936

40. Warburg, O., Christian, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Zymohexase.
Biochem. Zschr. 314, 149, 1943

41. Warburg, O., Christian, W. Wirkungsgruppe des Gärungsfermentes Zymohexase.
Biochem. Zschr. 311, 209, 1941/42

42. Wolf, H. P., Leuthardt, F. — Über Aldolasen, 3. kurze Mitteilung Die Aldolasespaltung von Fructose-1-phosphat und Fructosediphosphat in der Niere. Helvet. chim. acta 40, 1033, 1957

43. Würzner, H. P. — Glutamin-Oxalessigsäure-Transaminase (GOT), Glutamin-Brenztraubensäure-Transaminase (GPT) und Milchsäure-dehydrogenase (MDH) im Serum klinisch gesunder Hunde. Vet.-med. Diss. Berlin FU, 1959

44. Zierler, K. — Muscle membrane as a dynamic strukture and its permeability to aldolase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 227, 1958

45. Zierler, K. — Increased muscle permeability to aldolase produced by insulin and by albumine. Amer. J. Physiol. 192, 283, 1958

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Felix Müller für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 13. Oktober 1938 wurde ich, Hanno Schleicher, als viertes Kind meines Vaters, Direktor Dr. Ing. Manfred Schleicher und seiner Frau Marie, geb. de Fraiture, in Berlin-Charlottenburg geboren.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Im Herbst 1945 wurde ich in die Herz-Jesu-Schule in Berlin eingeschult. Ostern 1951 wurde ich Schüler des Charlottenburger Gymnasiums. Auf den Gabbes Lehranstalten bereitete ich mich auf die Reifeprüfung vor, die ich am 23. Oktober 1959 beim Senator für Volksbildung der Stadt Berlin bestand.

Mit dem Sommersemester 1960 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich an dieser Universität auch zu Ende führte. Am 3. April 1962 bestand ich die tierärztliche Vorprüfung und beendete am 8. 4. 1965 mit dem Bestehen des tierärztlichen Staatsexamens mein Studium.

Meine Praktikantenzeit absolvierte ich teils an der Poliklinik für kleine Haustiere, Berlin und teils in einer Großtierpraxis am Niederrhein. Mit der Wirkung vom 14. November 1965 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Im November 1965 kehrte ich nach Berlin zurück, um die Arbeiten an meiner Dissertation zu beenden, mit denen ich schon während des Studiums begonnen hatte. Seit dem 15. März 1966 bin ich als Tierarzt in der Industrie tätig.